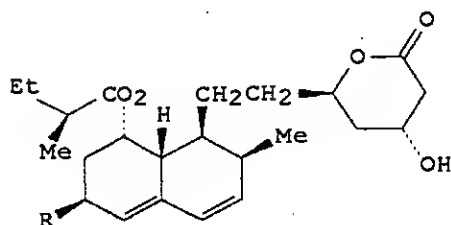


L1 ANSWER 1 OF 1 CAPLUS COPYRIGHT 2001 ACS
 AN 1982:404664 CAPLUS
 DN 97:4664
 TI ML-236B derivatives and their pharmaceutical use
 IN Terahara, Akira; Tanaka, Minoru
 PA Sankyo Co., Ltd., Japan
 SO Ger. Offen., 73 pp.
 CODEN: GWXXBX
 DT Patent
 LA German

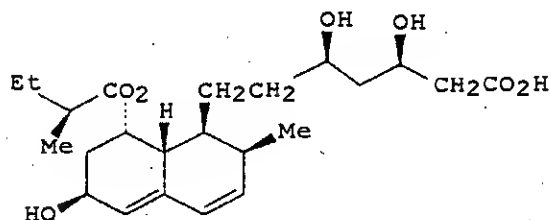
FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
	JP 57002240	A2	19820107	JP 1980-76127	19800606 <--
PRAI	JP 1980-76127		19800606		
	JP 1980-115483		19800822		
	JP 1980-124385		19800908		
	JP 1980-130311		19800919		
	US 1981-270846		19810605		

GI



I, R=H
 III, R=OH



II

AB cholesterol [57-88-5] Formation inhibitors are produced from ML 236B (I) [58948-09-7] by fermn. with fungi or bacteria. Thus, spores of Absidia coerulea IFO 4423 were inoculated into a pH 7 medium contg. glucose 2, K2HPO4 0.15, MgSO4.7H2O 0.15, NH4NO3 0.1, peptone 0.1, corn steep liquor 0.2, yeast ext. 0.1, and ZnSO4.7H2O 0.001% at 26.degree. for 2 days with shaking. Then, 0.05% I Na salt was added and incubation was continued for 5 days. The broth filtrate was made pH 3 with TCA and extd. with EtOAc. The ext. was chromatographed on silica gel to sep. M-4 (II) [81093-37-0]. M-4 was lactonized with a catalytic amt. of TCA to form 50.1 mg M-4 lactone (III) [60478-65-1].

#16 attachment
 09/836705

JP 522240

RECEIVED

JUN 11 2003

TECH CENTER 1600/2900

1. *Pharmaceutical industry*

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑯ 公開特許公報 (A)

昭57-2240

① Int. Cl.³

C 07 C 69/33

67/00

69/732

// A 61 K 31/215

識別記号

ADD

庁内整理番号

6556-4H

6556-4H

6408-4C

③ 公開 昭和57年(1982)1月7日

発明の数 1

審査請求 未請求

(全 4 頁)

④ ML-236B誘導体

② 特 願 昭55-76127

② 出 願 昭55(1980)6月6日

② 発 明 者 田中実

東京都品川区広町1丁目2番58

号三共株式会社中央研究所内

② 発 明 者 寺原昭

東京都品川区広町1丁目2番58

号三共株式会社醸酵研究所内

⑦ 出 願 人 三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目

1番地の6

② 代 理 人 弁理士 梶出庄治

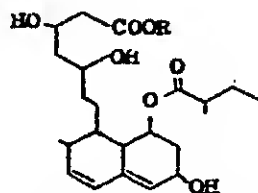
明 細 書

1. 発明の名称

ML-236B誘導体

2. 特許請求の範囲

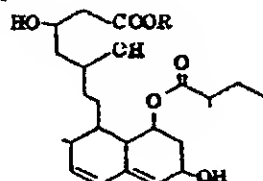
式



(式中、Rは水素原子、低級アルキル基またはアルカリ金属を示す。)で示されるML-236B誘導体。

3. 発明の詳細な説明

本発明は式



(I)

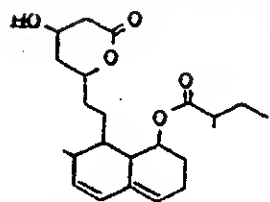
で示されるML-236B誘導体に関するものである。

上記式中、Rは水素原子；メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチルなどの低級アルキル基；ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属を示す。

前記式(I)で示される化合物は新規物質であり、動物に対するML-236B投与実験中に、その代謝産物として分離されたものである。

ML-236B自体は既知物質であり、青カビの一種ペニシリウム・チトリウム代謝産物より分離、精製された物質で、実験動物から分離した腸菌系や培養細胞系においてコレステロールの生合成をその律速酵素の3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル・コエンザイムAリダクターゼと混合することにより阻害し、動物の膽体レベルにおいても強力な血清コレステロールの低下作用を示すことが知られている(特開昭50-155690号、ジャーナル・オブ・アンチバイオティクス 29巻 1346-1348頁 1975年)。

ML-236B は次の化学構造を有している。



本発明者らはML-236Bを動物に投与してその代謝産物を研究中、前記式(1)で示される新規物質がML-236Bにはるかに優るコレステロール阻害活性を有することを見出した。前記式(1)で示される化合物の中、Rが水素原子で示される物質を以後DUM-4と略称する。

式(1)で示される化合物は次の方法で得られる。

実施例 1

ビーグル犬5匹(牡、平均体重10kg)にML-236Bを200mg/kg/dayの割合で投与し、3日間採尿した。この中3日の尿をXAD-2カラム500mlに通し、50%アセトン500mlで溶出し、

かけるジアゾメタンに代えて適当なジアゾアルカンを使用すると、該当するDUM-4のアルキルエステルが得られる。

実施例 2

兎肝臓ホモジネートを用いた次の酵素反応によりML-236BよりDUM-4を得た。

1) 酵素液

兎肝臓に3倍量の1.15% KCl-10mM リン酸緩衝液(pH 7.4)を加えてホモジナイズし、このホモジネートを9000gで20分間遠心分離し、上清画分を酵素液とした。

2) コファクター溶液

還元型ニコチンアミドアデニン

ジメチルサリチル酸ホスファート (NADPH) 3mg

MgCl₂ 溶液 (508mg/10ml) 0.1ml

1.15% KCl 溶液 0.3ml

0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.6ml

を混合し、全量1mlとし、これをコファクター溶液とした。

3) 反応溶液

酵素液 80 μ L, コファクター溶液 20 μ L および基質としてML-236Bを最終濃度1mMになるように2 μ L メタノール溶液として添加し、37℃で30分間振盪した。

上記反応によりDUM-4が生成し、この物質はTLC上(実施例1と同条件)、実施例1で得られたDUM-4と同一のR_f値を示した。このようにして得られたDUM-4は実施例1に記載の方法によりジアゾメタンでメチルエステル化するとDUM-4メチルエステルが得られる。また兎肝臓ホモジネートの代りに犬肝臓ホモジネートを用いて処理しても同様の結果が得られた。

実施例 3

DUM-4メチルエステル2mgを0.1N-NaOH 1mlに溶解させ、30℃で1時間加水分解する。これをクロロホルム1mlで洗浄し、水層を0.1N HClでpH8に補正し、XAD-2カラム(約5

昭和57-2240(2)

アセトンを減圧で除去した後、残渣をトリフルオロ酢酸でpH3に調整した。次いで1mlの酢酸エタールで3回抽出するとDUM-4が得られる。本化合物は薄層クロマトグラフィー(TLC)(TLCプレート:メルク社製シリカゲルArt 571, 溶媒:ベンゼン:アセトン:酢酸=50:50:3)によりR_f値0.45を示す。上記抽出液を飽和食塩溶液で洗浄し、ジアメタンのエーテル溶液を加え30分放置後、減圧蒸留した。残渣を55%メタノール10mlに溶解し、カラムクロマト(メルク社, RP-8, サイズB)にかけた。最初、55%メタノール200mlを流した後、60%メタノールで抽出し、初めの240mlは捨て、次のフラクション120mlを集めた。溶液を留去して乾固し、残渣を65%メタノール25mlに溶解、さらに高速液体クロマトグラフィー(JASCO-Trirotar, カラム: μ -ボンドパックC₁₈)により精製し、第4ピークを示す部分を分取して溶剤を留去するとDUM-4メチルエステルが無色油状体として得られた。なお、本発明に

メ)にかけ、20mlの蒸留水で洗った後、50mlアセトン15mlで溶出し、アセトンを留去させ、高速度液体クロマトグラフィーによりシングルのピークであることを確認(40mlメタノール1ml/minで溶出し、Retention time 13分)した後、減圧乾燥を行ない、DUM-4 Na塩0.8gが得られた。

式(1)で示される化合物は次の特性を有する。

A. DUM-4 メチルエステル

1) NMR スペクトル

重クロロホルム中内部基準にTMSを使用して200MHzで測定した。

(CDCl₃) δ ppm :

- 0.88 (3H, t, J=7.3 Hz)
- 0.89 (3H, d, J=6.5 Hz)
- 1.12 (3H, d, J=6.8 Hz)
- 1.1~1.7 (10H, m)
- 2.34 (1H, sex, J=7 Hz)
- 2.3~2.5 (2H, m)
- 2.49 (2H, d, J=6.4 Hz)

TLCプレート:メルク社製シリカゲル

Art 5715

溶媒:ベンゼン:アセトン(1:1)

R_f値 0.88

6) 高速度液体クロマトグラフィー (HPLC)

ウォーターズ社製HPLCにより、μ-ボンドパックC₁₈を使用、流速1ml/min、溶媒65%メタノールでRetention time 15分。

B. DUM-4 Na塩

1) NMR スペクトル

重メタノール中、内部基準にTMSを使用して200MHzで測定した。

(CD₃OD) δ ppm :

- 0.91 (3H, t, J=7.5 Hz)
- 0.92 (3H, d, J=7 Hz)
- 1.12 (3H, d, J=7 Hz)
- 1.1~1.8 (10H, m)
- 2.25 (1H, d, d, J=15, 7.6 Hz)
- 2.34 (1H, d, d, J=15, 5.5 Hz)
- 2.2~2.4 (3H, m)

- 2.53 (1H, m)
- 3.72 (3H, s)
- 3.78 (1H, m)
- 4.25 (1H, quin, J=7 Hz)
- 4.4 (1H, m)
- 5.42 (1H, m)
- 5.56 (1H, m)
- 5.90 (1H, d, d, J=9.8, 5.6 Hz)
- 5.99 (1H, d, J=9.8 Hz)

2) マススペクトル

N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミドでシリル化した後、日本電子製D-300型を用いて測定した。

m/e: 654 (M⁺), 552, 462, 372, 290, 272, 233, 231

3) 紫外吸収スペクトル (エタノール溶液)

λ_{max} (nm): 239.1, 237.3, 246.4

4) 赤外吸収スペクトル (薄膜法) cm⁻¹:

3400, 2950, 1730, 1600

5) TLC

2.48 (1H, m)

3.68 (1H, m)

4.07 (1H, m)

4.28 (1H, m)

5.36 (1H, m)

5.48 (1H, d, d, J=3, 2 Hz)

5.88 (1H, d, d, J=9.8, 5.3 Hz)

5.98 (1H, d, J=9.8 Hz)

2) 紫外吸収スペクトル (メタノール溶液)

λ_{max} (nm): 230.0, 237.2, 245.0

3) 赤外吸収スペクトル (KBr法) cm⁻¹:

3400, 2900, 1725, 1580

4) TLC

TLCプレート:メルク社製シリカゲル

Art 5715

溶媒:ベンゼン:アセトン:酢酸(50:50:3)

R_f値 0.45

5) HPLC

ウォーターズ社製HPLCにより、μ-ボンドパックC₁₈を使用、流速1ml/min、溶媒

40% メタノールで Retention time 13 分。

コレステロール合成阻害作用

副記式 (I) で示される化合物はコレステロール合成経路上の重要な基として知られる 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル・コエンザイム A リダクターゼ (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase) を特異的に阻害することが分つた。これら化合物のコレステロール合成阻害作用 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 234 巻 2835 頁 (1959 年) 記載の方法で測定] を第 1 表に示す。

第 1 表 コレステロール合成を 50%
阻害する濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

	$\mu\text{g}/\text{ml}$
DUM-4 メチルエステル	0.001
DUM-4 Na 塩	0.0008
ML-236B (対照)	0.01

特許第 57-2240 (4)

上述のように式 (I) で示される ML-236B 誘導体は、ML-236B と同様に血清コレステロール低下作用を有する。しかしながらその作用は ML-236B に比べてはるかに強力であり、ML-236B の作用からは予測できないものである。式 (I) で示される化合物は高脂血症治療剤として非常に有効である。

特許出願人 三共株式会社
代理人 弁護士 櫻 出 庄 治